



〔12〕发明专利申请公开说明书

〔21〕 申请号 91102127.2

〔51〕 Int.Cl⁵

C07K 7/36

〔43〕 公开日 1991 年 10 月 23 日

〔22〕申请日 91.4.9

〔30〕优先权

〔32〕90.4.9 〔33〕JP 〔31〕93656/90

〔32〕90.9.1 〔33〕JP 〔31〕231913/90

〔71〕申请人 中外制药株式会社

地址 日本东京

〔72〕发明人 村山荣五郎

星徹

〔74〕专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 程 伟

A61K 37/30

说明书页数: 37 附图页数: 9

〔54〕发明名称 杂种降钙素

〔57〕摘要

由一 人降钙素肽片段和一个动物源,如鳕鱼, 鲑鱼和鸡的降钙素肽片段构成的改进的杂种降钙素。人降钙素或人降钙素类似物以及动物源降钙素可以是天然降钙素或其类似物。杂种降钙素具有同鳕鱼,鲑鱼和鸡降钙素一样强的生物活性,它不引起包括恶心,消化道功能紊乱或抗原性等副作用。

△
20
▽

1. 一种由两个肽片段组成的杂种降钙素，其一为位于较靠近氨基末端侧的人降钙素或人降钙素类似物的肽片段，其二为位于较靠近羧基末端侧的动物源而非人源降钙素的肽片段。

2. 如权利要求1所述的杂种降钙素，其中较靠近氨基末端侧的肽片段含有至少10个人源降钙素的氨基酸残基，较靠近羧基末端侧的肽片段含有至少6个动物源而非人源降钙素的氨基酸残基。

3. 如权利要求1所述的杂种降钙素，其中人降钙素是天然人降钙素或者其类似物，动物源而非人源降钙素是天然动物源降钙素或其类似物。

4. 如权利要求1所述的杂种降钙素，其中非人源降钙素是来自鳕鱼、鲑鱼或鸡。

5. 一种由人降钙素的肽片段和动物源而非人源降钙素的肽片段组成的杂种降钙素，其第一个肽片段包括从氨基末端起第1位至第 n 位($n=10-28$)氨基酸残基，第二个肽片段包括向羧基末端接续的氨基酸残基。

6. 如权利要求1所述的杂种降钙素，其中第一个肽片段包括从氨基末端起的第一位至第 n 位($n=13-21$)氨基酸残基，并是天然人降钙素的一个肽片段，或者是一个天然人降钙素肽片段中少于两个氨基酸残基被替代，删除或加成后的人降钙素类似物的肽片段。

7. 如权利要求6所述的杂种降钙素，其中人降钙素类似物的肽片段中的缬氨酸残基代替天然人降钙素第8位蛋氨酸残基。

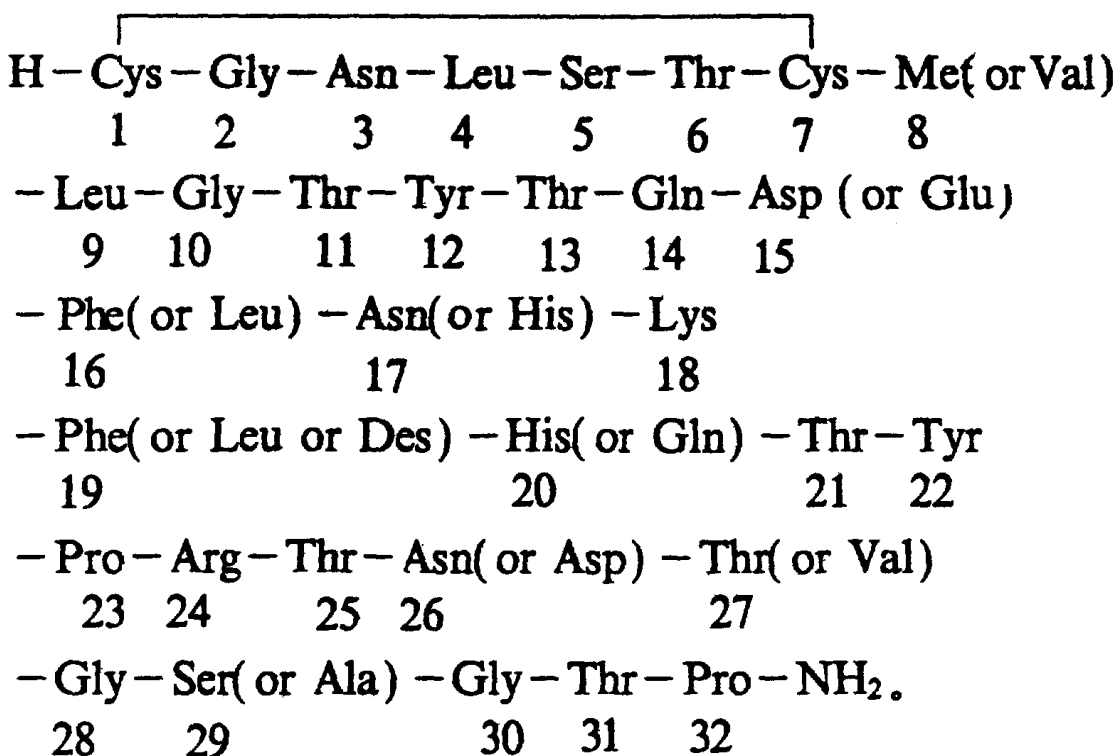
8. 如权利要求5所述的杂种降钙素，其中第二个肽片段包括鳕鱼、鲑鱼或鸡降钙素从氨基末端第 n 位($n=14-22$)和接续的氨基酸残基，并是天然鳕鱼、鲑鱼

或鸡降钙素的一个肽片段，或是一个天然鳕鱼，鲑鱼或鸡降钙素中少于三个氨基酸残基被替代，删除或加成的降钙素类似物的肽片段。

9. 如权利要求8所述的杂种降钙素，其中第二个肽片段是天然鳕鱼，鲑鱼降钙素的肽片段，或者是天然鳕鱼或鲑鱼降钙素的肽片段中一个氨基酸残基被替代，或删除的降钙素类似物的肽片段。

10. 一种杂种降钙素，其中从氨基末端起第1到第16位氨基酸残基序列同天然人降钙素的第1至第16位氨基酸残基的序列相同，第17至第32位氨基酸残基序列同天然鳕鱼或鲑鱼或鲑鱼降钙素的第17至32位氨基酸残基序列相同。

11. 一种具有下列结构式的杂种降钙素：



12. 如权利要求11所述的杂种降钙素，它具有下列结构式：

$\overbrace{\text{H}-\text{Cys}-\text{Gly}-\text{Asn}-\text{Leu}-\text{Ser}-\text{Thr}-\text{Cys}-\text{Met}}$
 -Leu-Gly-Thr-Tyr-Thr-Gln-Asp-Phe
 -His-Lys-Leu-Gln-Thr-Tyr-Pro-Arg
 -Thr-Asn-Thr-Gly-Ser-Gly-Thr-Pro-NH₂。

13. 如权利要求11所述的杂种降钙素，它具有下列一种的结构式：

$\overbrace{\text{H}-\text{Cys}-\text{Gly}-\text{Asn}-\text{Leu}-\text{Ser}-\text{Thr}-\text{Cys}-\text{Met}}$
 -Leu-Gly-Thr-Tyr-Thr-Gln-Asp-Phe
 -His-Lys-Leu-Gln-Thr-Tyr-Pro-Arg
 -Thr-Asp-Val-Gly-Ala-Gly-Thr-Pro-NH₂,

$\overbrace{\text{H}-\text{Cys}-\text{Gly}-\text{Asn}-\text{Leu}-\text{Ser}-\text{Thr}-\text{Cys}}$
 -Val-Leu-Gly-Thr-Tyr-Thr-Gln
 -Asp-Phe-His-Lys-Leu-Gln-Thr
 -Tyr-Pro-Arg-Thr-Asp-Val-Gly
 -Ala-Gly-Thr-Pro-NH₂;

$\overbrace{\text{H}-\text{Cys}-\text{Gly}-\text{Asn}-\text{Leu}-\text{Ser}-\text{Thr}-\text{Cys}}$
 -Met-Leu-Gly-Thr-Tyr-Thr-Gln
 -Asp-Phe-His-Lys-Gln-Thr-Tyr
 -Pro-Arg-Thr-Asp-Val-Gly-Ala
 -Gly-Thr-Pro-NH₂;

$\overbrace{\text{H}-\text{Cys}-\text{Gly}-\text{Asn}-\text{Leu}-\text{Ser}-\text{Thr}-\text{Cys}}$
 -Met-Leu-Gly-Thr-Tyr-Thr-Gln

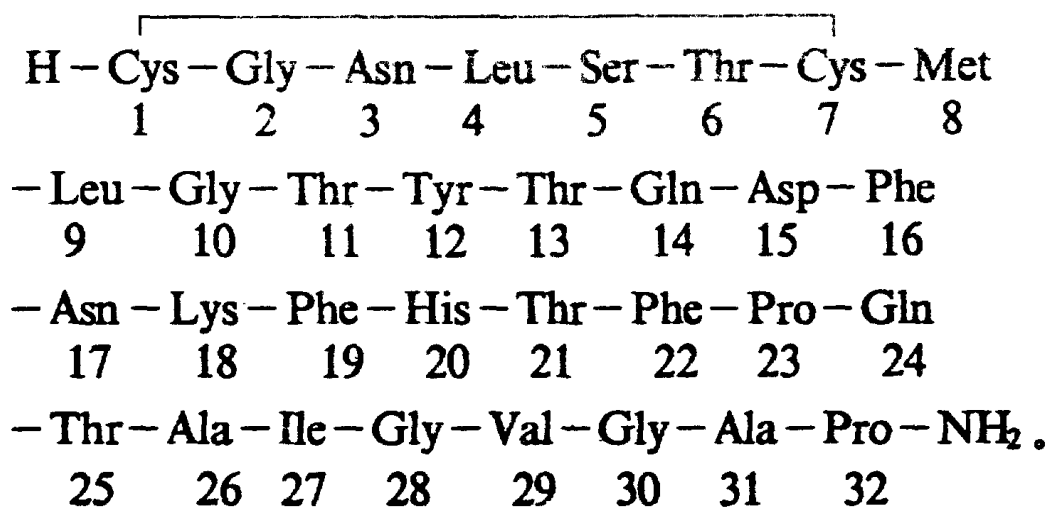
– Glu – Leu – His – Lys – Leu – Gln – Thr
– Tyr – Pro – Arg – Thr – Asn – Thr – Gly
– Ser – Gly – Thr – Pro – NH₂ ; 和

H – Cys – Gly – Asn – Leu – Ser – Thr – Cys
– Met – Leu – Gly – Thr – Tyr – Thr – Gln
– Asp – Phe – Asn – Lys – Phe – His – Thr
– Tyr – Pro – Arg – Thr – Asn – Thr – Gly
– Ser – Gly – Thr – Pro – NH₂.

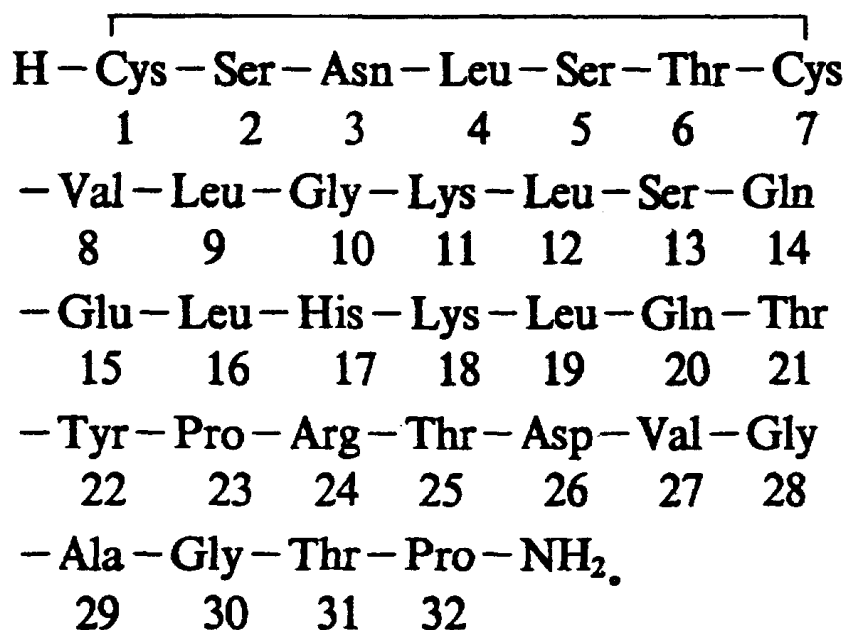
杂种降钙素

本发明涉及新的，具有生物活性的降钙素类似物。

已知鳊鱼，鲑鱼，鸡，猪，人，牛，羊和鼠的体内天然存在降钙素，这些天然存在的降钙素由 32 个氨基酸组成。例如，人类降钙素具有下述肽结构：



鳊鱼的降钙素具有下述的肽结构：



上述的人类和动物中固有的降钙素以下集中称为“天然

降钙素”。

日本特许公开 No. 277698/1988, 284198/1988, 287800/1988, 以及生物化学杂志第159卷, 125页(1986), (J. Biochem. Vol 159, p. 125(1986), 内分泌学杂志第117卷第80页(1987), (Endocrinology, Vol 117 p. 80 (1987)), 以及生物化学杂志第162卷, 第399页(1987), 公开了天然降钙素的类似物。天然降钙素的类似物包括: 经其它氨基酸残基替代天然降钙素中至少一个氨基酸残基的类似物(替代型); 天然降钙素中删除至少一个氨基酸残基的类似物(删除型); 天然降钙素或在其末端中的氨基酸残基间中加入至少一个氨基酸残基的类似物(加成型)以及具有两个或多个替代型, 删除型和加成型组合的类似物。当两个或多个氨基酸残基被替代, 删除或加成时, 它们可以使得肽结构发生联接或切断。这种类型的非天然的降钙素在下文中被称作“降钙素类似物”。

天然人类降钙素生来即存在于人类体内, 但是它被证明在人体内的生物活性很低。另外, 天然动物源例如鲑鱼, 鳕鱼和鸡降钙素, 不是人源的, 对人类却具有高的生物活性, 并且可以用来治疗骨质疏松, 肿瘤性高血钙和佩吉特氏病。另外, 鳕鱼降钙素类似物已经是商品化的治疗用产品。然而, 动物源降钙素和它们的类似物引起人类的副作用, 例如严重的恶心, 消化道功能紊乱, 以及抗原性。人类的降钙素几乎不引起这些副作用。

由天然动物源降钙素和其类似物, 而不是人类的降钙素和其类似物引起的恶 心见于下述参考文献:

1). K. Takahashi, et al., “Gan to Kagaku Ryoho (Cancer and Chemotherapy)”, Vol. 12, No. 10, 2004-2010(1985);

2). J. Egawa et al., "Gan no Rinsho (Clinical Aspects of Cancer)", Vol. 30, No. 3, 251-258 (1984); and

3). G. F. Mazzuoli et al., Calcif. Tissue Int., 38, 3-8 (1986).

由天然动物源降钙素和其类似物引起的消化道功能紊乱见于下述参考文献:

1) K. Jonderko, Gut (England), 30, 430-435 (1989);

2) K. Jonderko, et al., J. Clin. Gastroenterol., 12, 22-28 (1990) and

3) J. Hotz et al., Digestion, 20, 180-189 (1980).

天然动物源降钙素和其类似物的抗原性见下述参考文献:

1) F. R. Singer et al., J. Clinical Invest., 51, 2331-2338 (1972);

2) J. G. Haddad et al., J. Clinical Invest., 51, 3133-3141 (1972); and

3) A. Grauer et al., J. Bone and Mineral Res., 5, 387-391 (1990).

本发明的目的在于提供现有技术中未涉及到的新的降钙素类似物。简言之, 本发明提供具有对人体高生物活性, 而且几乎不引起人体副作用的降钙素。本发明的降钙素为一种人降钙素同动物源, 而非人源的降钙素的杂种, 即由人源钙素肽片段和动物源而非人源降钙素的肽片段组成的一种杂种降钙素。

本发明人发现, 动物源降钙素引起人体副作用的活性,

大多数在氨基末端，特别是在由 1 至 16 位末端氨基酸残基构成的肽片段中。也发现，当所有这些 16 个末端氨基酸残基可被替代时，经过替代至少 10 个这些氨基酸残基能消除那些不需要的副作用。

对于人源和动物源降钙素的主要生物活性而言，羧酸末端的氨基酸序列很重要。该序列可参见下述文献：

- 1) Rene Maier et al. , FEBS Letters, 48, 68 (1974);
- 2) Rene Maier et al. , Clinical Endocrinology, 5, 3275 (1976);
- 3) R. M. Epand et al. , Eur. J. Biochem. , 159,125 (1986); and
- 4) D. M. Findlay et al. , Endocrinology, 117,399 (1987) .

本发明人发现，上述的肽片段，即具有主要生物活性的，位于羧酸末端的肽片段，不具有引起人体不需要的副作用的活性部位，基于这一发现本发明人开发出一种杂种降钙素。因此，从减轻副作用的观点考虑，由第 11 位和向羧酸端依次部位的氨基酸残基组成的肽片段可以包括人降钙素或动物源降钙素。

另外，从生物活性方面考虑，比人源降钙素生物活性还高的降钙素为优选。因此，较邻近羧基端的肽片段优选为非人源的动物源的，并且比人降钙素生物活性还高的肽片段。在这方面，考虑中的肽片段要有至少 4 个氨基酸残基，优选为有至少 10 个氨基酸残基。

根据上述观点，本发明的杂种降钙素由两个肽片段组成，其一包括人降钙素片段从氨基端开始第 1 至第 10 位氨基酸残基，其二包括非人源的动物源降钙素片段向羧基端的第 29 位至第 32 位氨基酸残基，并带有由第 11 位至第 28

位氨基酸残基组成的，具有人或动物源降钙素氨基酸序列的中间肽片段。倘若需要的话，可以在第 11 至第 28 位氨基酸残基间的肽片段的任何部位，将人降钙素的氨基酸序列转移至非人源降钙素的氨基酸序列。

为了达到进一步减轻副作用的目的，氨基末端的肽片段优选由人降钙素的第 1 至第 13 位氨基酸残基构成。为了达到进一步增加生物活性的目的，第 22 至第 32 位的肽片段优选由动物源的肽片段，而非人源的肽片段来构成。氨基末端从第 14 至 21 位的肽片段可以具有任一类型降钙素的氨基酸序列，在那个中间片段的任何部位，均可以将人降钙素的氨基酸序列转移至非人源的氨基酸序列。在最优选的情况下，本发明的杂种降钙素由一个来自人源降钙素其氨基末端第 1 至第 16 位的肽片段和一个来自非人源降钙素从第 17 至第 32 位的肽片段组成。

附图说明

图 1 是在用各种类型的降钙素治疗中，血浆中钙浓度的时间关系图。

图 2 是随着各种类型的降钙素的给药，刺激阈值的时间关系图。

图 3 是各种类型降钙素给药后，大鼠的体重变化图。

图 4 是各种类型降钙素给药后，大鼠的食物吸收图。

图 5 是鲑鱼降钙素和抗体结合浓度之间的关系图。

图 6 至 9 为说明鲑鱼降钙素和两种杂种降钙素同抗鲑鱼降钙素人类血清结合效果。

本发明所用的“人降钙素”(human Calcitonin)是指天然人降钙素和非天然人降钙素类似物。同理，“非人源降钙素”(non-human calcitonin)或者动物源而非人源降钙素(calcitonin derived from animals other than humans)是

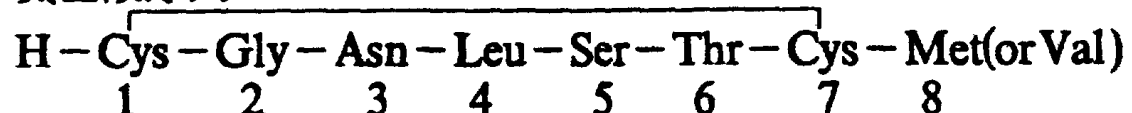
指动物源而非人源的天然降钙素和非人源降钙素的非天然类似物。优选的但非限定的动物包括，鲑鱼、鳕鱼和鸡。在这两种类型的降钙素类似物中，替代，删除或加成氨基酸残基的数目不限定于任何特定的值，但优选是它少于 5。假如该肽片段含有少于 5 个氨基酸残基，其替代、删除或加成的氨基酸残基数，优选为不超过 1，假如该肽片段含有不超过 10 个氨基酸残基，相应的替代，删除或加成的氨基酸残基数优选为少于 3。

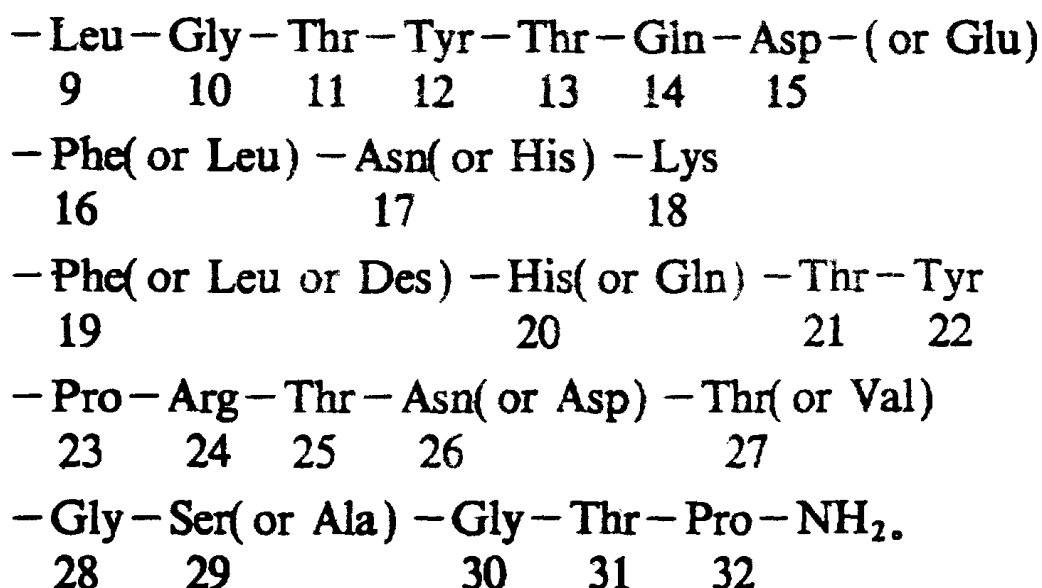
关于人降钙素的肽片段，其氨基末端的第一个 10 个氨基酸残基序列优选是与天然人降钙素的序列相同，或者也可以是人降钙素类似物的肽片段具有与天然人降钙素相同的氨基酸序列，不同的只是位置 8 上的蛋氨酸残基被缬氨酸残基所替代。对于所有的人降钙素的肽片段来说，优选的类似物为少于两个氨基酸残基替代，删除或者加成天然降钙素，最优选的类似物是全部肽片段同天然型的不同仅仅是位置 8 处的蛋氨酸残基发生替代。

关于动物源降钙素的肽片段，它优选是同相应的天然降钙素的肽片段相同，或者它也可以是非人源降钙素类似物的肽片段，该类似物肽片段是少于 3 个氨基酸残基替代，删除或加成所述的天然型肽片段。较优选的类似物为其中仅一个氨基酸序列替代或删除天然型肽片段。

优选的动物源降钙素应为对人体具有较高生物活性的衍生的降钙素。这些动物包括鱼类，如鲑鱼，鳕鱼和鸟类，如鸡。较优选的是鲑鱼和鳕鱼，特别优选的是鲑鱼。

根据这些事实，本发明之杂种降钙素优选地具有下列氨基酸序列：





本发明的杂种降钙素中，例如鲑鱼，鳕鱼和鸡这类动物源的全部降钙素的部分结构均由其相应的人降钙素片段来替代，所述动物源降钙素结构部分当人体服用时，会引起副作用，如恶心，消化道功能紊乱和抗原性，而所述的人降钙素片段不引起任何副作用。因此；上述的结构部分引起的副作用会被减轻或者完全消除。这就等于说本发明之杂种降钙素具有经过相应的非人源降钙素替代的人降钙素的药理活性部位，以增强人降钙素的理想的生理活性。

用固相合成法如用聚合树脂，或者经液相合成法等有机合成领域中常用方法可以合成本发明的杂种降钙素。合成相对少量的肽时，优选采用固相合成。而合成大量肽时，优选采用液相合成。在本说明书后续的例子中，采用固相合成法来合成肽。然而，假如需大量合成本发明的杂种降钙素，优选采用液相合成法，这也是已知的肽合成技术。

通常的液相合成步骤的合成至少从两个肽片段开始，每一个片段都含有两个或多个氨基酸残基，然后连续地联接

这些肽片段，最后获得所需的带有以上特殊的氨基酸序列的肽(在本发明中，所需的肽是上述的杂种降钙素)。液相合成的进一步特征是使肽合成反应在液态介质中进行，特别是在如二甲基甲酰胺(DMF)或四氢呋喃等介质中进行。一个部分肽典型地含有2-20，优选为3-15个氨基酸残基。在优选的情况下，能合成这些部分肽的大约2-10单位，然后再连续联接合成所需的肽。

在上述的肽合成中，氨基酸的反应衍生物典型地被用作起始物质。假如起始氨基酸含有活性官能团，而不是那些形成肽键的官能团，这些活性官能团被优先用保护基团保护，这些保护基团在肽合成结束后再去掉。本发明中欲生产的肽具有1-7个二硫键，随着1-7个序列的部分肽的合成，可以在任何阶段形成。然而，这个二硫键稳定性差，在肽合成结束后被优先形成。在下述的固相合成法中也优选采用保护和去保护步骤和形成二硫键的各种条件。

固相合成法是一种通过将氨基酸残基键合到载体树脂上来合成具有所需氨基酸序列的肽的方法。用自动合成器可以自动完成该方法。

那些被用于固相合成中的树脂包括氯甲基树脂，羟甲基树脂，4-(羟甲基)苯乙酰氨基甲基树脂(4-(oxymethyl) phenylacetamidomethyl resins)，二苯甲基胺树脂和聚丙烯酰胺树脂。

如需要的话，用于这些合成中的氨基酸保护一些氨基酸，例如 α -氨基保护基团包括苄氧甲基基团(Z)，四丁基羟基羰基基团(Boc)(tertiary butyl-oxycarbonyl group)，9-芴甲氧羰基基团(9-fluorenylmethyl-oxycarbonyl group (Fmoc)，) 甲酰基团(HOC)和乙酰基团(Ac)。

α -羧基保护基团包括苄基基团(Bzl), 四丁基基团(Bu^t) 甲基基团(Me), 乙基基团(Et)和苯甲酰甲基基团(Pac)。那些能用来保护氨基酸侧链的基团包括苄基基团(Bzl), p-甲苯磺酰基团(Tos), P-硝基苯酚基团(NO), 二苯甲基基团(Bzh), 乙酰氨基甲基基团(Acm)(acetamidomethyl group), 四丁基基团(Bu^t), 四丁基羧基基团(Boc), 环己基基团(CHex)和4-甲氧基-2,3,6-三甲基苯磺酰基基团(Mtr)。这些保护基团的一个或多个基团可按不同目的加以使用。

采用碳化二亚胺, 或在活性酯的帮助下, 经过脱氢缩合可以进行氨基酸序列加成反应。所用的碳化二亚胺包括二环己基碳化二亚胺和1-乙基3-(3-二甲基氨丙基)碳化二亚胺, 采用的活性酯(active esters)包括N-羟基丁二酰胺酯(-OSu), 五氟苯酚酯(-OPfp)(pentafluorophenol ester)以及二羟基苯基三嗪酯(-ODhbt), (dihydroxobenztriazine ester)

可采用的反应催化剂包括: DMF, THF, 二氯甲烷, 氯仿, 乙酸乙酯, 二恶烷, DMSO, N-甲基吡咯烷酮(N-methylpyrrolidone.), 吡啶和水。

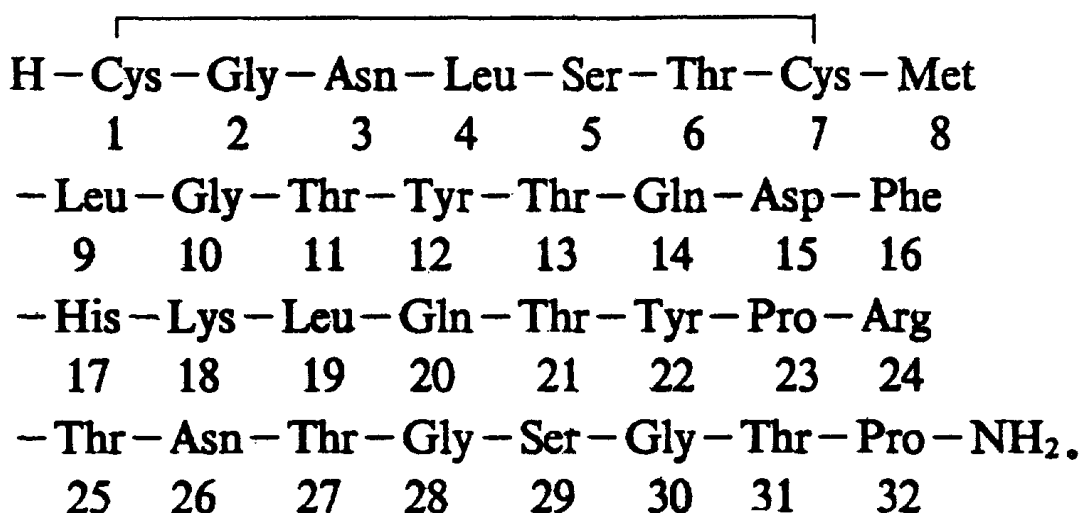
根据要消除的保护基团的类型以及所要完成的目的, 可以使用各种脱保护剂。这些试剂包括氟化氢, 三氟乙酸, 三氟甲烷磺酸, 氨水/甲醇, 溴化氢/乙酸, 碳载氢/钯(hydrogen/palladium on carbon), 乙酸汞, 乙酸/锌粉和碱/水-甲醇。

在合成过程中或合成后, 可采用各种纯化技术, 如反相色谱法, 正相色谱法, 离子交换色谱法以及凝胶过滤色谱法等再结晶。通过大气或铁氰化钾的氧化作用可以形成二硫链。

以下的实施例用来进一步说明本发明，但不仅限于此。

实施例 1 至 6 说明本发明的杂种降钙素样品的合成, 实施例 7 描述经实例 1 至 6 合成的降钙素样品的氨基酸组成分析结果。实施例 8 至 10 描述评估本发明杂种降钙素主要活性实验。

实施例 1 人(1-16)/ 鲑鱼(17-32) 杂种降钙素的合成



用自动合成器通过固相合成法进行合成。

(1) 将脯氨酸装入二苯甲基胺脂树(BHA)

取 10 克 BHA 树脂($-\text{NH}_2$: 0.38 mmol/g)使其在 100 ml DMF 中悬浮溶胀。去掉上清液后, 再加入 100 ml 的 DMF, 随后加入 BocProOH (15 mmol), DCC (20 mmol) 和 HOBT (20 mmol), 摇动该混合物室温过夜。用玻璃过滤器过滤后, 用二氯甲烷清洗得到的树脂。

随后，加入 200 ml 的含 10 V/V% 乙酸酐的二氯甲烷溶液，室温下摇动该混合物 1 个小时以封塞残余的氨基基团。反应完成后，用二氯甲烷清洗所述的树脂，并真空干

燥。

干燥后，加入 50 ml 的含 50 V/V% 三氟乙酸的二氯甲烷溶液，室温下摇动该混合物1小时，连续用二氯甲烷，甲醇，二氯甲烷和三乙胺溶液冲洗得到的树脂，真空干燥。

(2) 氨基酸的接续加成反应

将步骤 1 中得到的 1 克树脂装入自动合成器的反应柱中，在下述条件下，连续加入氨基酸。

I 反应: DMF 溶剂内室温反应30分钟，

II 清洗: 用 DMF 室温下清洗 10 分钟，

III 去掉 Fmoc: 用 20 v/v% 哌啶，在DMF 溶剂中，室温，10分钟。

IV 清洗: 用 DMF 室温清洗10分钟，经反复(1) -(4) 的步骤，接着脯氨酸(Pro)被加成 31 个氨基酸，采用的氨基酸见表 1.

表 1

Fmoc-L-Thr(But)-ODhbt	0.4308
Fmoc-Gly-OPfp	0.367
Fmoc-L-Ser(But)-ODhbt	0.419
Fmoc-Gly-OPfp	0.367
Fmoc-L-Thr(But)-ODhbt	0.430
Fmoc-L-Asn-OPfp	0.412
Fmoc-L-Thr(But)-ODhbt	0.430
Fmoc-L-Arg(Mtr)-OPfp	0.641
Fmoc-L-Pro-OPfp	0.400
Fmoc-L-Tyr(But)-OPfp	0.495

Fmoc-L-Thr(But)-ODhbt	0.430
Fmoc-L-Gln-OPfp	0.423
Fmoc-L-Leu-OPfp	0.411
Fmoc-L-Lys(Boc)-OPfp	0.503
Fmoc-L-His(Boc)-OPfp	0.510
Fmoc-L-Phe-OPfp	0.438
Fmoc-L-Asp (OBut)-OPfp	0.457
Fmoc-L-Gln-OPfp	0.423
Fmoc-L-Thr(But)-ODhbt	0.430
Fmoc-L-Tyr(But)-OPfp	0.495
Fmoc-L-Thr(But)-ODhbt	0.430
Fmoc-Gly-OPfp	0.367
Fmoc-L-Leu-OPfp	0.411
Fmoc-L-Met-OPfp	0.426
Fmoc-L-Cys(Trt)-OPfp	0.595
Fmoc-L-Thr(But)-ODhbt	0.430
Fmoc-L-Ser(But)-ODhbt	0.419
Fmoc-L-Leu-OPfp	0.411
Fmoc-L-Asn-OPfp	0.412
Fmoc-Gly-OPfp	0.367
Fmoc-L-Cys(Trt)-OPfp	0.595

反应后，用氟化氢从肽上去掉保护基团和所述的树脂，用乙醚冲洗所述的肽。沉淀物被溶于 50 V/V% 的乙酸水溶液内，滤掉不溶物质。过滤液被冷冻干燥，得约 600 mg 的粗肽。

(3) 纯化和形成二硫键

将部分(约 500 mg) 的粗肽溶于含 0.1 V/V% TFA 的

水内，将所述的溶液装入高效液相色谱的 ODS 柱中。

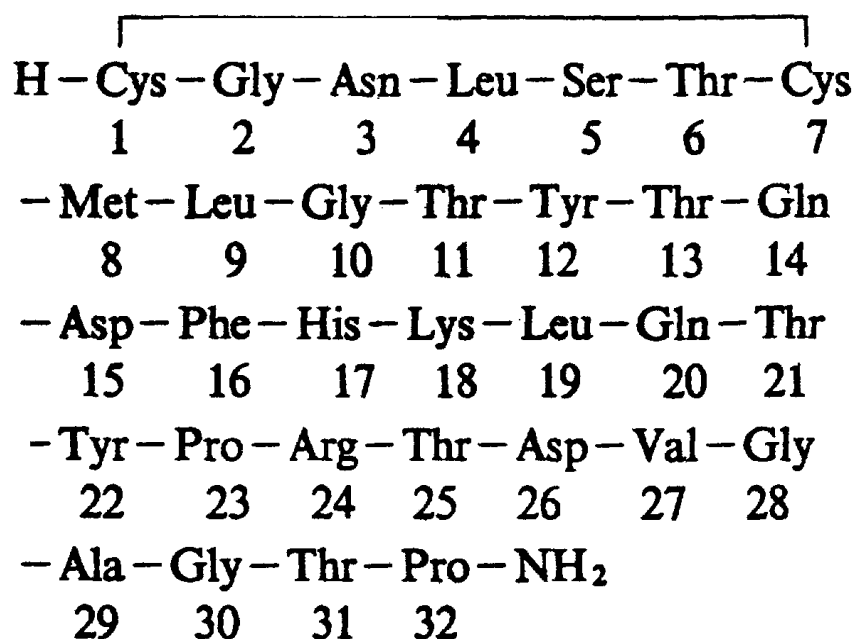
用溶液 A(含 0.1 V/V%TFA 的乙腈)和溶液 B (含0.1 V/V% TFA 的水)，用从20% 经 30% 至40% 的递增方式的阶式梯度(A/B V/V%)洗脱所述的柱子，收集 30% 洗脱处的馏分，冷冻干燥。

冷冻干燥后的 46 mg 肽溶于50 ml 0.05 V/V% 的乙酸中，用3M 的氨水将其溶液的 pH 调节至 8.5。接着，加入 1.5 ml 的 0.1 M 的 $K_3Fe(CN)_6$ ，并室温下搅拌该混合物 30 分钟，以形成二硫键。用 50% 的乙酸将 pH 调至5.0 后，加入阴离子树脂(Cl^- 型)，搅拌该混合物20 分钟，随后滤掉树脂。

浓缩滤液，并装入高效液相色谱的 ODS 柱中用上述相同的步骤再次纯化。收集 30% 洗脱处的馏分，冷冻干燥得所需的肽 28 mg。

实施例 2

人(1-16)/ 鳕鱼(17-32)杂种降钙素的合成



(1) 氨基酸的接续加成反应

将按实例 1 中步骤(1)制备的 1 克脯氨酸结合 BHA 树脂装入自动合成器的反应柱中, 以实例 1 中步骤(2)的相同反应条件加入氨基酸。所用的氨基酸列入表 2 中。

表 2

Fmoc-L-Thr(But)-ODhbt	0.430 g
Fmoc-Gly-OPfp	0.367
Fmoc-L-Ala-OPfp	0.378
Fmoc-Gly-OPfp	0.367
Fmoc-L-Val-OPfp	0.400
Fmoc-L-Asp (OBut)-OPfp	0.457
Fmoc-L-Thr(But)-ODhbt	0.430
Fmoc-L-Arg(Mtr)-OPfp	0.641
Fmoc-L-Pro-OPfp	0.400
Fmoc-L-Tyr(But)-OPfp	0.495
Fmoc-L-Thr(But)-ODhbt	0.430
Fmoc-L-Gln-OPfp	0.423
Fmoc-L-Leu-OPfp	0.411
Fmoc-L-Lys(Boc)-OPfp	0.503
Fmoc-L-His(Boc)-OPfp	0.510
Fmoc-L-Phe-OPfp	0.438
Fmoc-L-Asp (OBut)-OPfp	0.457
Fmoc-L-Gln-OPfp	0.423

Fmoc-L-Thr(But) - ODhbt	0.430
Fmoc-L-Tyr(But) - OPfp	0.495
Fmoc-L-Thr(But) - ODhbt	0.430
Fmoc-Gly - OPfp	0.367
Fmoc-L-Leu - OPfp	0.411
Fmoc-L-Met - OPfp	0.426
Fmoc-L-Cys(Trt) - OPfp	0.595
Fmoc-L-Thr(But) - ODhbt	0.430
Fmoc-L-Ser(But) - ODhbt	0.419
Fmoc-L-Leu - OPfp	0.411
Fmoc-L-Asn - OPfp	0.412
Fmoc-Gly - OPfp	0.367
Fmoc-L-Cys(Trt) - OPfp	0.595

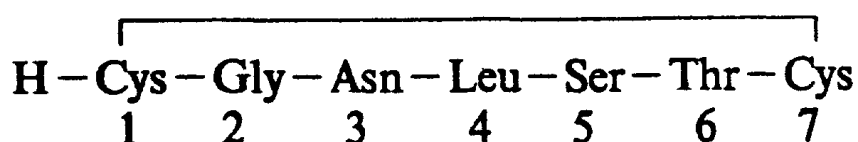
反应结束后, 用实例 1 中步骤(2) 所述的同样方法处理肽 - 树脂, 得约 510 mg 粗肽。

(2) 纯化和形成二硫键

用实例 1 中步骤(3) 的相同步骤处理部分(约 450 mg) 的粗肽, 以纯化和形成二硫键。从而得到 32 mg 纯化后的肽。

实施例 3

人类似物(1-16, Met⁸ → Val⁸) / 鳕鱼(17-32) 杂种降钙素的合成。



- Val	- Leu	- Gly	- Thr	- Tyr	- Thr	- Gln
8	9	10	11	12	13	14
- Asp	- Phe	- His	- Lys	- Leu	- Gln	- Thr
15	16	17	18	19	20	21
- Tyr	- Pro	- Arg	- Thr	- Asp	- Val	- Gly
22	23	24	25	26	27	28
- Ala	- Gly	- Thr	- Pro	- NH ₂		
29	30	31	32			

(1) 氨基酸的接续加成反应

将按实例 1 中步骤(1)制备的 1 克脯氨酸结合 BHA 树脂装入自动合成器的反应柱中, 以实例 1 中步骤(2)的相同反应条件加入氨基酸。所用的氨基酸见表 3

表 3

Fmoc-L-Thr(But)-ODhbt	0.4308
Fmoc-Gly-OPfp	0.367
Fmoc-L-Ala-OPfp	0.378
Fmoc-Gly-OPfp	0.367
Fmoc-L-Val-OPfp	0.400
Fmoc-L-Asp (OBut)-OPfp	0.457
Fmoc-L-Thr(But)-ODhbt	0.430
Fmoc-L-Arg(Mtr)-OPfp	0.641
Fmoc-L-Pro-OPfp	0.400
Fmoc-L-Tyr(But)-OPfp	0.495
Fmoc-L-Thr(But)-ODhbt	0.430

Fmoc-L-Gln-OPfp	0.423
Fmoc-L-Leu-OPfp	0.411
Fmoc-L-Lys(Boc)-OPfp	0.503
Fmoc-L-His(Boc)-OPfp	0.510
Fmoc-L-Phe-OPfp	0.438
Fmoc-L-Asp (OBut)-OPfp	0.457
Fmoc-L-Gln-OPfp	0.423
Fmoc-L-Thr(But)-ODhbt	0.430
Fmoc-L-Tyr(But)-OPfp	0.495
Fmoc-L-Thr(But)-ODhbt	0.430
Fmoc-Gly-OPfp	0.367
Fmoc-L-Leu-OPfp	0.411
Fmoc-L-Val-OPfp	0.400
Fmoc-L-Cys(Trt)-OPfp	0.595
Fmoc-L-Thr(But)-ODhbt	0.430
Fmoc-L-Ser(But)-ODhbt	0.419
Fmoc-L-Leu-OPfp	0.411
Fmoc-L-Asn-OPfp	0.412
Fmoc-Gly-OPfp	0.367
Fmoc-L-Cys(Trt)-OPfp	0.595

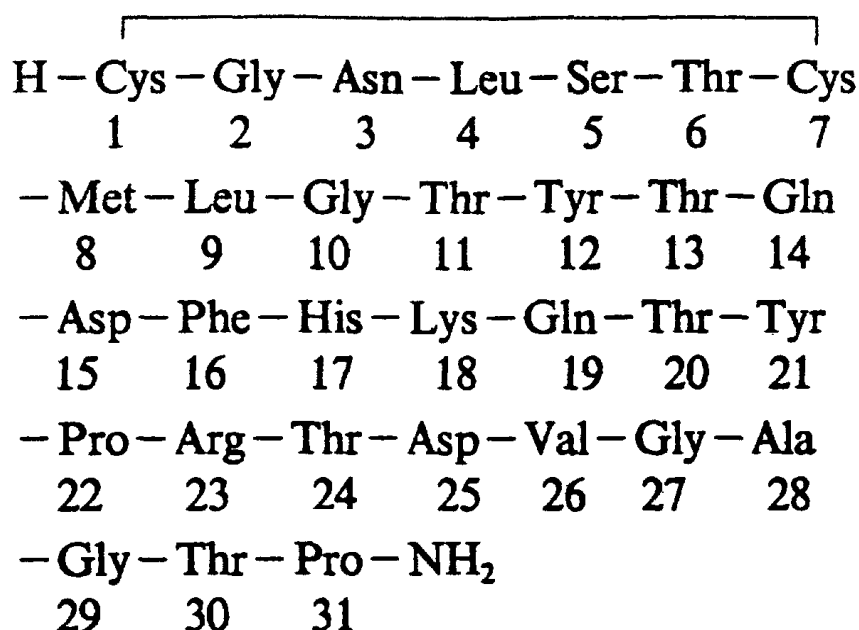
反应结束后，用实例 1 中步骤(2)所述的同样方法处理肽-树脂，得约 580 mg 的粗肽。

(2) 纯化和形成二硫键

用实例 1 中步骤(3)的相同步骤处理部分(约 500 mg)的粗肽，以纯化和形成二硫键。从而，得到 35 mg 纯化后的肽。

实施例 4

人(1-16) / 鳕鱼(17-31, Des Leu¹⁹) 杂种降钙素类似物的合成。



(1) 氨基酸的接续加成反应

将按实例 1 中步骤(1)制备的 1 克脯氨酸结合 BHA 树脂装入自动合成器的柱中, 以实例 1 中步骤(2)的相同反应条件加入氨基酸。所用的氨基酸列入表 4。

表 4

Fmoc - L - Thr(But) - ODhbt	0.430 g
Fmoc - Gly - OPfp	0.367
Fmoc - L - Ala - OPfp	0.378
Fmoc - Gly - OPfp	0.367
Fmoc - L - Val - OPfp	0.400
Fmoc - L - Asp (OBut) - OPfp	0.457

Fmoc-L-Thr(But) - ODhbt	0.430
Fmoc-L-Arg(Mtr) - OPfp	0.641
Fmoc-L-Pro - OPfp	0.400
Fmoc-L-Tyr(But) - OPfp	0.495
Fmoc-L-Thr(But) - ODhbt	0.430
Fmoc-L-Gln - OPfp	0.423
Fmoc-L-Lys(Boc) - OPfp	0.503
Fmoc-L-His(Boc) - OPfp	0.510
Fmoc-L-Phe - OPfp	0.438
Fmoc-L-Asp (OBut) - OPfp	0.457
Fmoc-L-Gln - OPfp	0.423
Fmoc-L-Thr(But) - ODhbt	0.430
Fmoc-L-Tyr(But) - OPfp	0.495
Fmoc-L-Thr(But) - ODhbt	0.430
Fmoc-Gly - OPfp	0.367
Fmoc-L-Leu - OPfp	0.411
Fmoc-L-Met - OPfp	0.426
Fmoc-L-Cys(Trt) - OPfp	0.595
Fmoc-L-Thr(But) - ODhbt	0.430
Fmoc-L-Ser(But) - ODhbt	0.419
Fmoc-L-Leu - OPfp	0.411
Fmoc-L-Asn - OPfp	0.412
Fmoc-Gly - OPfp	0.367
Fmoc-L-Cys(Trt) - OPfp	0.595

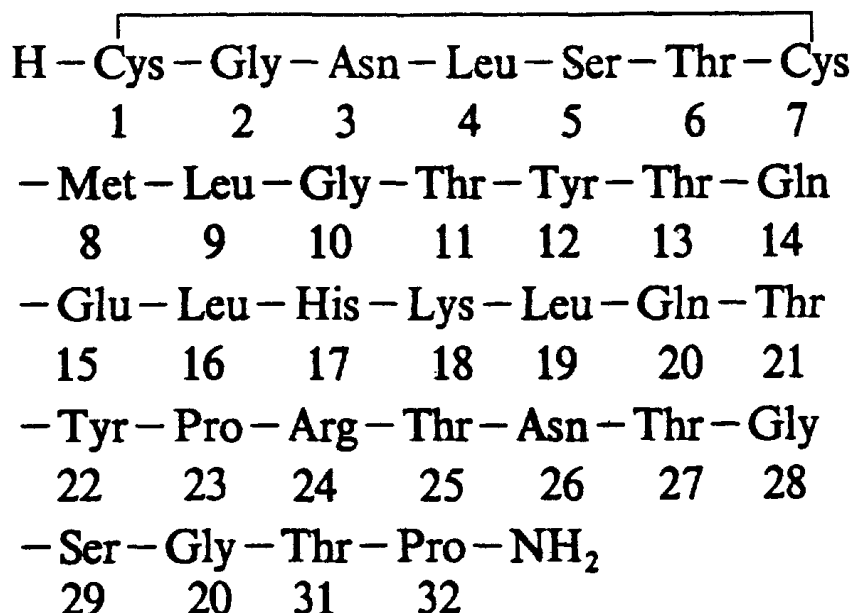
反应结束后, 用实例 1 中步骤(2)所述的同样方法处理所述的肽-树脂, 得约 520 mg 的粗肽。

(2) 纯化和形成二硫键

用实例 1 中步骤(3)的相同步骤处理部分(约 450 mg)粗肽, 以纯化和形成二硫键, 从而, 得到 23 mg 的纯化后的肽。

实施例 5

人(1-13)/ 鲑鱼(14-32) 杂种降钙素的合成



采用自动合成器, 以固相合成方法进行合成。

(1) 将脯氨酸装入二苯甲基胺(BHA)树脂

取 10 克 BHA 树脂($-\text{NH}_2$: 0.38 mmol/g), 使其在 100 ml 的 DMF 中悬浮溶胀。去掉上清液后, 另外加入 100 ml 的 DMF, 随后加入 19 mmol BocProOH, 19 mmol DCC, 和 19 mmol HOBT。摇动该混合物室温过夜。用玻璃过滤器过滤, 用二氯甲烷冲洗得到的树脂。接着, 加入 200 ml 含 10 V/V% 乙酸酐的二氯甲烷溶液, 室温下搅拌该混合物 1 小时, 以封塞残余的氨基基团。反应完成后, 用

二氯甲烷冲洗所述的混合物，并真空干燥。

干燥后，加入 50 ml 的含 50 V/V% 的三氟乙酸的二氯甲烷溶液，并在室温下搅拌该混合物 1 小时。用玻璃过滤器过滤后，得到的树脂用二氯甲烷，甲醇，二氯甲烷和三乙胺连续冲洗，然后真空干燥。

用氨基酸分析仪分析部分得到的树脂发现每克树脂被结合入 0.31 mmol 的脯氨酸。

(2) 氨基酸的接续加成反应

将步骤(1)中得到的 1 克树脂装入自动合成器的柱子中，随后按下列条件加入氨基酸。

(I) 加成反应: DMF 溶剂，室温下反应 30 分钟;

(II) 冲 洗: 用 DMF , 室温下冲洗 10 分钟;

(III) 去掉 Fmoc: 用 20%V/V 哌啶，在 DMF 溶剂中，室温下 10 分钟;

(IV) 冲 洗: 用 DMF, 室温冲洗 10 分钟。

反复步骤(1) - (4)，接的脯氨酸(Pro)加入 31 个氨基酸。所用的氨基酸列入表 5。

表 5

Fmoc-L-Thr(But)-ODhbt	0.430 g
Fmoc-Gly-OPfp	0.367
Fmoc-L-Ser(But)-ODhbt	0.419
Fmoc-Gly-OPfp	0.367
Fmoc-L-Thr(But)-ODhbt	0.430
Fmoc-L-Asn-OPfp	0.412
Fmoc-L-Thr(But)-ODhbt	0.430
Fmoc-L-Arg(Mtr)-OPfp	0.641

Fmoc-L-Pro-OPfp	0.400
Fmoc-L-Tyr(But) -OPfp	0.495
Fmoc-L-Thr(But) -ODhbt	0.430
Fmoc-L-Gln-OPfp	0.423
Fmoc-L-Leu-OPfp	0.411
Fmoc-L-Lys(Boc) -OPfp	0.503
Fmoc-L-His(Boc) -OPfp	0.510
Fmoc-L-Leu-OPfp	0.411
Fmoc-L-Glu (OBut) -OPfp	0.468
Fmoc-L-Gln-OPfp	0.423
Fmoc-L-Thr(But) -ODhbt	0.430
Fmoc-L-Tyr(But) -OPfp	0.495
Fmoc-L-Thr(But) -ODhbt	0.430
Fmoc-Gly-OPfp	0.367
Fmoc-L-Leu-OPfp	0.411
Fmoc-L-Met-OPfp	0.426
Fmoc-L-Cys(Trt) -OH	0.464
Fmoc-L-Thr(But) -ODhbt	0.430
Fmoc-L-Ser(But) -ODhbt	0.419
Fmoc-L-Leu-OPfp	0.411
Fmoc-L-Asn-OPfp	0.412
Fmoc-Gly-OPfp	0.367
Fmoc-L-Cys(Trt) -OH	0.464

反应后，用氟化氢去掉肽上的保护基团，用乙醚冲洗所述的肽。沉淀物溶于 50 % V/V 乙酸水溶液，滤掉不溶物质。冷冻干燥滤液得约 720 mg 的粗肽。

(3) 纯化和形成二硫键

将部分(约 700mg)的粗肽溶于含 0.1 V/V% TFA 的水中, 将所述溶液装入高效液相色谱的ODS 柱内。

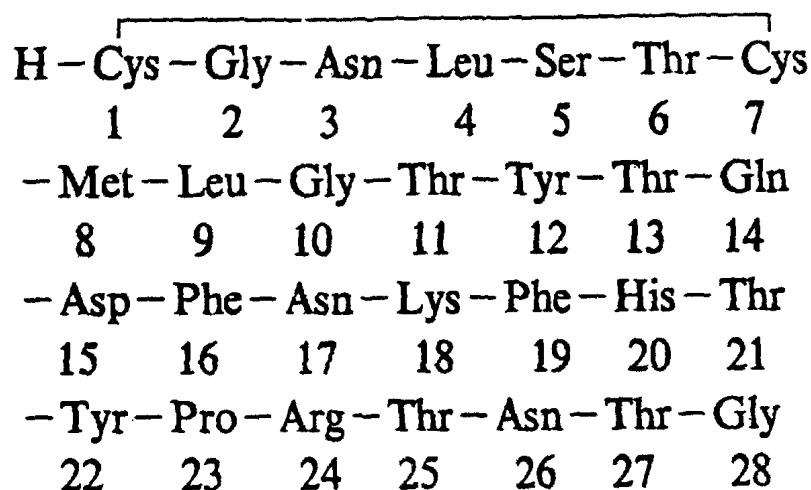
采用由含 0.1 V/V% TFA 的乙腈和水组成的溶剂体系, 用乙腈阶式梯度从20% (V/V) 至 30% 到 40% 递增的方式来洗脱所述的柱子, 收集 30 % V/V 洗脱处的馏分, 并冷冻干燥(初级纯化)。

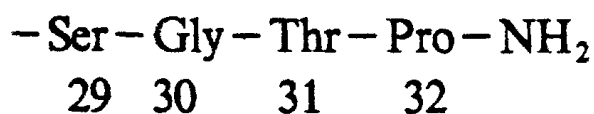
冷冻干燥后的肽(约 80 mg)溶于 80 ml 的 0.05 % V/V 乙酸中, 用 3M 氨水将其 pH 调至 8.5。随后, 加入 1.5 ml 0.1 M $K_3Fe(CN)_6$ 并在室温下搅拌混合物 30 分钟, 形成二硫键。用 50 % V/V 的乙酸将 pH 调至 5.0 后, 加入阴离子交换树脂(Cl^- 型), 搅拌该混合物 20 分钟, 随后滤掉树脂。

浓缩滤液, 再上 ODS 柱, 用初级纯化中采用的同样的溶剂体系, 以乙腈阶式梯度的方式, 从 25, 27, 至 30 到 35% V/V 洗脱该柱(次级纯化)。收集 30% 洗脱处的馏分, 冷冻干燥得 53mg 所述的肽。

实施例 6

人(1-21) / 鲑鱼(22-32) 杂种降钙素的合成:





将按实例 5 中步骤(1)制备的 1 克脯氨酸结合 BHA 树脂装入自动合成器的柱子, 与实例 5 中步骤(2)的相同条件下加入氨基酸。所用的氨基酸见表 6

表 6

Fmoc-L-Thr(But)-ODhbt	0.430g
Fmoc-Gly-OPfp	0.367
Fmoc-L-Ser(but)-ODhbt	0.419
Fmoc-Gly-OPfp	0.367
Fmoc-L-Thr(But)-ODhbt	0.430
Fmoc-L-Asn-OPfp	0.412
Fmoc-L-Thr(But)-ODhbt	0.430
Fmoc-L-Arg(Mtr)-OPfp	0.641
Fmoc-L-Pro-OPfp	0.400
Fmoc-L-Tyr(But)-OPfp	0.495
Fmoc-L-Thr(But)-ODhbt	0.430
Fmoc-L-His(Boc)-OPfp	0.510
Fmoc-L-Phe-OPfp	0.438
Fmoc-L-Lys(Boc)-OPfp	0.503
Fmoc-L-Asn-OPfp	0.412
Fmoc-L-Phe-OPfp	0.438
Fmoc-L-Asp (OBut)-OPfp	0.457

Fmoc-L-Gln-OPfp	0.423
Fmoc-L-Thr(But)-ODhbt	0.430
Fmoc-L-Tyr(But)-OPfp	0.495
Fmoc-L-Thr(But)-ODhbt	0.430
Fmoc-Gly-OPfp	0.367
Fmoc-L-Leu-OPfp	0.411
Fmoc-L-Met-OPfp	0.426
Fmoc-L-Cys(Trt)-OPfp	0.595
Fmoc-L-Thr(But)-ODhbt	0.430
Fmoc-L-Ser(But)-ODhbt	0.419
Fmoc-L-Leu-OPfp	0.411
Fmoc-L-Asn-OPfp	0.412
Fmoc-Gly-OPfp	0.367
Fmoc-L-Cys(Trt)-OPfp	0.595

反应后，按实例 5 中步骤(2)采用的同样方法处理肽-树脂，得约 860 mg 粗肽。

(2) 纯化和形成二硫键

以实例 5 中步骤(3)相同的步骤处理部分(约 850 mg)的粗肽，以纯化和形成二硫键，浓缩得到的滤液，再次上色谱 ODS 柱，然后用初级纯化中采用的相同溶剂体系，用乙腈阶式梯度从 24，经 26，28 至 30 一直到 35 V/V% 来洗脱所述的柱子(次级纯化)。收集 28 V/V% 洗脱处的馏分，冷冻干燥得 66 mg 所需的肽。

实例 7

氨基酸组分的分析

每一份经实例 1-6 制备的纯化后杂种降钙素，在 6N HCl 中 150 ℃ 水解 1 小时，用氨基酸分析仪分析所述的氨基酸组分，其结果见表 7。

表 7

氨基酸	例 1	例 2	例 3	例 4	例 5	例 6
Asx	3.14(3)	3.12(3)	3.12(3)	3.17(3)	2.11(2)	4.50(4)
Thr	6.43(7)	5.32(6)	5.44(6)	5.65(6)	6.37(7)	6.86(7)
Ser	1.79(2)	0.85(1)	0.82(1)	0.84(1)	1.71(2)	1.64(2)
Glx	2.34(2)	2.26(2)	2.35(2)	2.28(2)	3.49(3)	1.00(1)
Gly	4.14(4)	4.20(4)	4.14(4)	4.08(4)	4.01(4)	4.57(4)
Ala	0 (0)	1.01(1)	1.02(1)	0.96(1)	0 (0)	0 (0)
Val	0 (0)	1.07(1)	2.01(2)	1.12(1)	0 (0)	0 (0)
Met	0.97(1)	0.98(1)	0 (0)	0.90(1)	1.01(1)	0.93(1)
Leu	3.15(3)	3.11(3)	3.10(3)	2.03(2)	4.28(4)	2.00(2)
Tyr	2.02(2)	2.06(2)	2.02(2)	2.06(2)	2.12(2)	2.01(2)
Phe	1.04(1)	1.06(1)	1.04(1)	1.07(1)	0 (0)	2.07(2)
His	1.02(1)	1.03(1)	1.12(1)	1.08(1)	1.05(1)	0.80(1)
Lys	1.03(1)	1.04(1)	1.02(1)	1.06(1)	1.05(1)	0.92(1)
Arg	1.01(1)	1.00(1)	0.98(1)	0.99(1)	0.99(1)	0.85(1)
Pro	1.97(2)	1.92(2)	1.95(2)	1.69(2)	1.84(2)	2.06(2)

注: 括号内为理论值

实施例 8

检定生物活性

由实例 1-6 中制备的 6 份新的降钙素溶于含 0.1% BSA(小牛血清)的 0.1M 乙酸钠缓冲液中, 将其经尾静脉注入(4 周令)已禁食 24 小时的雄性大鼠 1 小时后, 用 OCPC 方法 (Calcium C-Test Wako of Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) 测量血清钙浓度。能引起血清钙浓度下 10% 的降钙素活性定为 10ml, 每毫克单位的降钙素的数值称之为“特定活性”。其结果见表 8。

表 8

	新降钙素	特定活性(U/mg)
例	1	2106*
	2	2639
	3	2262
	4	2611
	5	2575
	6	1792

其中 * 为两次测量的平均值

实施例 9

降钙素对高血钙的效果

方法:

给 5 周龄 SD 雄性大鼠连续 4 天口服维生素 D₃ (5 mg/kg)，建立高血钙大鼠实验模型。第 5 天时，分别皮下注射人(1-16) / 鲑(17-32) 杂种降钙素(杂种降钙素 1)，鲑鱼降钙素和人降钙素，每种用量 4 IU/kg. 在给定的时间间隔内取血样，测血浆中的钙浓度。

结果和讨论:

试验降钙素的血浆钙浓度的时间关系图见附图 1。由图 1 所知，所有的杂种降钙素 1，鲑鱼降钙素和人降钙素试验，均引起高血钙浓度的降低，因此很清楚本发明的杂种降钙素同鲑鱼降钙素和人降钙素对治疗高血钙具有同样的效果。

实施例 10

降钙素的止痛效果

方法:

(I) 动物

采用 10 只体重为 2.7-3.2 kg 的雄性家兔(Kbl: JW)。

(II) 插入心室内给药用的导管。

用戊巴比妥(30 mg/kg, i. v.) 麻醉，在立体定位器上固定家兔。切开头顶皮后，将心室内给药导管(塑料制品)插入每个动物左心室，牙骨质固定(以前囟处调节固定器: 后, 4.0 mm; 侧, 5.5 mm, 中 5.5 mm.) 1 周恢复期后，家兔供下述实验使用。实验后，注入亚甲蓝证实导管的位置。

(III) 抗损伤感受试验(Antinociception Test)

在兔笼内饲养家兔，用牙科钻头在上主门牙的两侧开

一直径为 1mm, 深为 1mm 的孔。将刺激电极插入每个孔, 用电刺激器(Nihon Kohden Corp 产品)以各种电压实施电刺激(5 毫秒, 5Hz, 3 秒长)。以测量刺激阈值(V), 该阈值可诱导动物的舔食反应(舔吃和下腭和唇的运动)在给药前 1 小时测量, 以及在给药后立即测量, 而且在给药后 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0 和 4.0 小时分别测量。

试验的药物是人(1-16) / 鲑鱼(17-32)杂种降钙素(杂种降钙素 1), 鲑鱼降钙素和人降钙素, 每种药物均经心室内给药, 其剂量等于 8 IU/kg, 用生理盐水做对照。

结果及讨论:

试验降钙素的刺激阈与时间关系见附图 2。由图 2 所知, 三种降钙素均引起阈值的相对增高, 其峰值在给药后 0.5-1.5 小时出现。因此经计算本发明的杂种降钙素同鲑鱼降钙素和人降钙素对疼痛作用具有相同的效果。

实施例 11

降钙素在抑制体重增加和食欲方面的作用。

方法:

给大鼠肌肉注射人(1-16) / 鲑(17-32)杂种降钙素(杂种降钙素 1), 人降钙素和 Elcatonin, 24 小时后, 测量它们的体重和食物消耗情况。

结果:

肌注各种降钙素大鼠体重的变化见附图 3, 它们的食物消耗见附图 4, 每种降钙素以三种不同剂量给药: 12.5 IU/kg, 50 IU/kg 和 200 IU/kg, 对于体重的变化, 测量值被平均在 5 只大鼠身上, 对于食物消耗情况, 5 只大鼠的测

量值被加到一起。

讨论:

附图 3 和 4 清楚的显示, 鲑降钙素和 Elcatonin 对抑制体重增加和食欲方面效果均同剂量相关, 而杂种降钙素 1 和人降钙素对食物消耗和体重方面未显出差异。因此可以说本发明的杂种降钙素同人降钙素相比, 几乎对体重增加和食欲不产生作用。

实例 12

降钙素对胃排空时间的作用。

向禁食数天的雌性小猎兔犬经某一静脉注射人 (1-16) / 鲑 (17-32) 杂种降钙素 (杂种降钙素 1), 鲑降钙素, 人降钙素和生理盐水。1 小时后, 伴 25ml 的水口服肠溶阿司匹林片 (含 200mg 活性组分)。此后, 在给定的时间间隔下, 经另外的脑静脉取血样, 用常规方法取得血浆保存在 -20°C 下, 直到测量。

随着阿司匹林经过肠壁, 大多数消化的阿司匹林被代谢掉, 并以水杨酸的形式进入血流。因此, 血浆中的水杨酸为判定阿司匹林的一种标记。200 μl 乙醇被加入 50 μl 血浆中以 10,000rpm 速度离心该混合物 1 分钟, 得到的上清液送 HPLC 测定。

结果:

每种降钙素对胃排空时间的延迟作用共汇入表 9。计算降钙素给药至阿司匹林吸收的时间与注射生理盐水至阿司匹林吸收时间之间的差, 以判断每个动物的胃排空时间的延迟。

表 9

降钙素 时间	剂量	Lag 时间			延迟		
	$\mu\text{g}(\text{IU})/\text{kg}$	h			h		
杂种降钙素 1	0.6(1.2)	1.9	4.8	7.7	0.0	3.2	6.6
	10(21.0)	5.1	18.0	21.4	3.8	16.3	20.3
鲑鱼降钙素	0.1(0.4)	2.0	2.0		0.3	0.7	
	0.3(1.2)	2.7	4.5	11.1	0.0	3.9	10.0
	0.6(2.4)	22.0	30.0	45.0	9.4	29.4	43.0
人降钙素	6(1.2)	3.0	3.9	4.0	1.3	2.6	2.9
	100(20.0)	5.0	6.9		4.4	5.0	

注: Lag 时间: 从服用阿司匹林至其吸收的时间,

延迟时间: 降钙素和生理盐水给药至阿司匹林吸收的时间差

讨论:

如表 9 所示, 鲑降钙素具有很强的延迟胃排空时间作用, 而人降钙素这方面作用则弱。在延迟胃排空时间方面杂种降钙素 1 同人降钙素更相像而不是象鲑降钙素。因此可以说本发明杂种降钙素 1 可以较大剂量活性单位来使用, 而不象鲑钙素。

实例 13

降钙素对清醒狗的胃肠道运动的影响。

方法:

取体重约 10kg 的健的康的小猎兔犬, 静脉注射戊巴比妥钠使其麻醉, 在无菌条件下打开腹腔。

将转换器(Extraluminal force transducers)缝在胃窦部, 十二指肠, 空肠的浆膜上, 测量环状肌肉收缩, 如 Itoh et al. 所报道(Itoh et al. Gastroenterol Jpn. 12, 275 1977)

这些转换器的导线伸出腹腔之外, 然后通过肩胛骨之间的皮肤切口。

腹部手术之后, 在右前颈处做一 5cm 长的纵向切口暴露颈外静脉。

用一 Silastic 管 (French size 8.5, Dow corning Midland, MI), 将其经静脉插入上腔静脉, 并将其缝在邻近的皮肤上, 作为试验药物的静脉注射通道。

手术后, 用一套式保护器固定狗, 以保护导线和 Silastic 管。

分别把狗圈在各自的狗笼内每天下午 5 点自由饲市售狗饲料和水。用热笔书写记录仪 (WR-3101, Graphitic, Tokyo, Japan) 通过将转换器的导线连接在放大器 (UG-5, Nihon Kohden, Tokyo, Japan) 接线上记录胃肠道运动活动。

术后约两周, 胃肠道收缩能力可分为两个主要活动型, 消化间和消化状态型。

在消化间状态型, 在胃窦部可见 IMC (Interdigestive migrating motor complex) 出现 100 至 120 分钟的规律性间隔, 并以恒定的速度移动通过十二指肠和空肠。

在所有的动物中, 进食则破坏了规律性的 IMC 型。在消化间状态过程中, 进行所有试验。将药物溶于 0.9 % 的生理盐水中, 经 Silastic 管给药, 给药量为约每 10 秒中为

0.3 ml/kg.

胃窦部的 IMC 结束后的 10 分钟, 随后用 0.90 % 的生理盐水冲洗胃窦部。

一直到给药出现的下一个 IMC 才测量时间, 并将该时间作为药物对胃肠道运动的抑制活性的指标。

其结果见表 10.

表 10

鲑降钙素	剂量, $\mu\text{g/kg}$	0.1	0.3	1.0	3		
	(U/kg)	(0.4)	(1.2)	(4.0)	(12)		
	IMC 延迟	0	1	2	3		
人降钙素	剂量 $\mu\text{g/kg}$	100	300	1000			
	(U/kg)	(20)	(60)	(200)			
	IMC 延迟	0	0.5	0.5			
杂种降钙素 1	剂量 $\mu\text{g/kg}$	0.03	0.1	1.0	3.0	100	
	(U/kg)	(0.06)	(0.21)	(2.1)	(6.3)	(210)	
	IMC 延迟	0	0.5	1	1	1	
杂种降钙素 2	剂量 $\mu\text{g/kg}$	0.3	1.0	3.0	10	30	100
	(U/kg)	(0.5)	(1.8)	(5.4)	(18)	(54)	(180)
	IMC 延迟	0	0.5	1	1	1	1

注: 1“IMC 延迟”是指:

- 0 给药后180 分钟内出现的下一个 IMC
- 0.5 给药后 300 分钟内, 180 分钟以上出现的下一个 IMC
- 1 给药后一天出现的下一个IMC
- 2 给药后两天出现的IMC
- 3 给药后三天出现的IMC

2. 杂种降钙素1 是人(1-16) / 鲑(17-32) 降钙素, 而杂种降钙素 2 是人(1-21) / 鲑(22-32) 降钙素。

讨论:

如表 10 所见, 根据静脉给药剂量鲑降钙素抑制清醒狗的下一个 IMC 的出现。

在 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 剂量下, 它延迟 3 天出现下一个 IMC , 另外, 人降钙素仅对IMC 有轻微的作用。

虽然杂种降钙素也抑制 IMC, 这些组合物仅延迟一天出现下个 IMC, 尽管是在最大的剂量时(100 $\mu\text{g}/\text{kg}$)。

这些结果清楚地显示杂种降钙素对清醒狗胃肠道运动具有比鲑降钙素较弱的作用。

这些结果也表明杂种降钙素比鲑降钙素可能很少会引起对胃肠道的反作用。

实例 14

抗鲑降钙素人类抗体同杂种降钙素之间的交叉反应。

方法:

通过固相合成的常规步骤合成鲑降钙素, 经过 Tejedor

方法(Tejedor , E and Ballesta, J. P. G; Analytical Biochemistry, 127, 143-149 (1982)) 用碘¹²⁵标记鲑降钙素。

由 Dr. Frederick R. Singer (CEDERS-SINAI MEDICAL CENTER) 提供被证明鲑降钙素给药后, 其中含抗体的 4 种人血清。这些血清对鲑钙素的抗体滴度如下:

NO. 1	1: 4000	NO. 2	1: 8000
NO. 3	1: 8000	NO. 4	1: 2000

1) 测定血清稀释比

用 0.1 M 硼酸盐缓冲液做为反应缓冲液, 该溶液含有 0.5% BSA, 0.9% NaCl, 0.1% NaN₃ 和 0.05% 吐温 20 (Tween 20) 。将该反应缓冲液, 抗鲑降钙素人类血清(用反应缓冲液稀释到 100-6400 倍) 以及标记后的降钙素溶液以下述各自的量一道装入一个辅助管(Spitz type of Salschted Inc. 大小为 12 × 75 mm)

(I) 反应缓冲液	★ 1	★ 2
	300 μ l	400 μ l
(II) 抗鲑降钙素人类血清	100 μ l	0 μ l
(III) 标记后的降钙素溶液		
($\approx$ 20,000 cpm)	100 μ l	100 μ l

★ 1 完全结合(B) ★ 2 非特异性结合(NSB)

用 500 μ l 的 0.2% BGG(小牛 γ - 球蛋白, Sigma) 与反应液充分混合, 再用 1ml 25% PEG 6000 进一步混合, 充分搅拌后, 使其置室温下 15 分钟。然后用斗式离心机(05RP-22, Hitachi) 离心反应 10 分钟, 温度为 4 $^{\circ}$ C, 转速为 3000 rpm。吸出去掉上清液, 用珈玛计数器测量残余物的放射性活性水平。其结果见附图 5

2) 碘¹²⁵标记的鲑降钙素同鲑降钙素或杂种降钙素之间的竞争反应。

将反应缓冲液，各种类型的降钙素，抗鲑降钙素人类血清以及标记后的降钙素溶液以下述各自的量加入一个辅助管(an assist tube)，以同样的方法处理来测定血清稀释度。

I) 反应缓冲液	★ 1 200 μ l	★ 2 400 μ l	★ 3 300 μ l
II) 降钙素	100 μ l	0 μ l	0 μ l
III) 抗鲑降钙素人血清	100 μ l	0 μ l	100 μ l
IV) 标记后的降钙杂溶液 ($\approx$ 20,000 cpm)	100ul	100 μ l	100 μ l
	(B)	(NSB)	(NS)

所有的两种杂种降钙素为:1, 人(1-16) / 鲑(17-32)降钙素; 2, 人(1-21) / 鲑(22-32)降钙素。

结果和讨论:

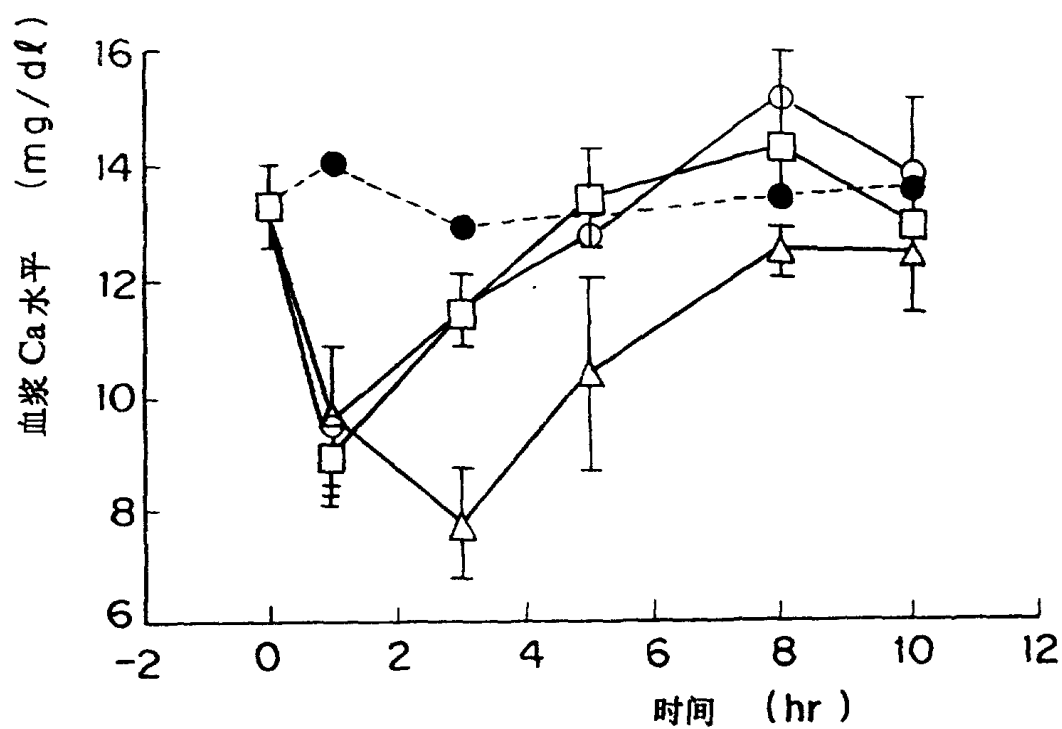
检查对于抗鲑降钙素人血清 1 号(附图 5)碘¹²⁵ 标记的鲑降钙素是否能同鲑降钙素发生竞争。当用抗鲑降钙素人血清 2-4 号时，得相同的曲线。这些结果表明在用量为至少 1 ng /ml 时，鲑降钙素开始同标记的鲑降钙素竞争。

四种血清试验提出抗鲑降钙素人类血清(附图 6-9)均不识别杂种降钙素 1 和 2。

从而得出本发明的杂种降钙素可能被做为一种用于那些产生抗鲑降钙素抗体的病人有效的药物。

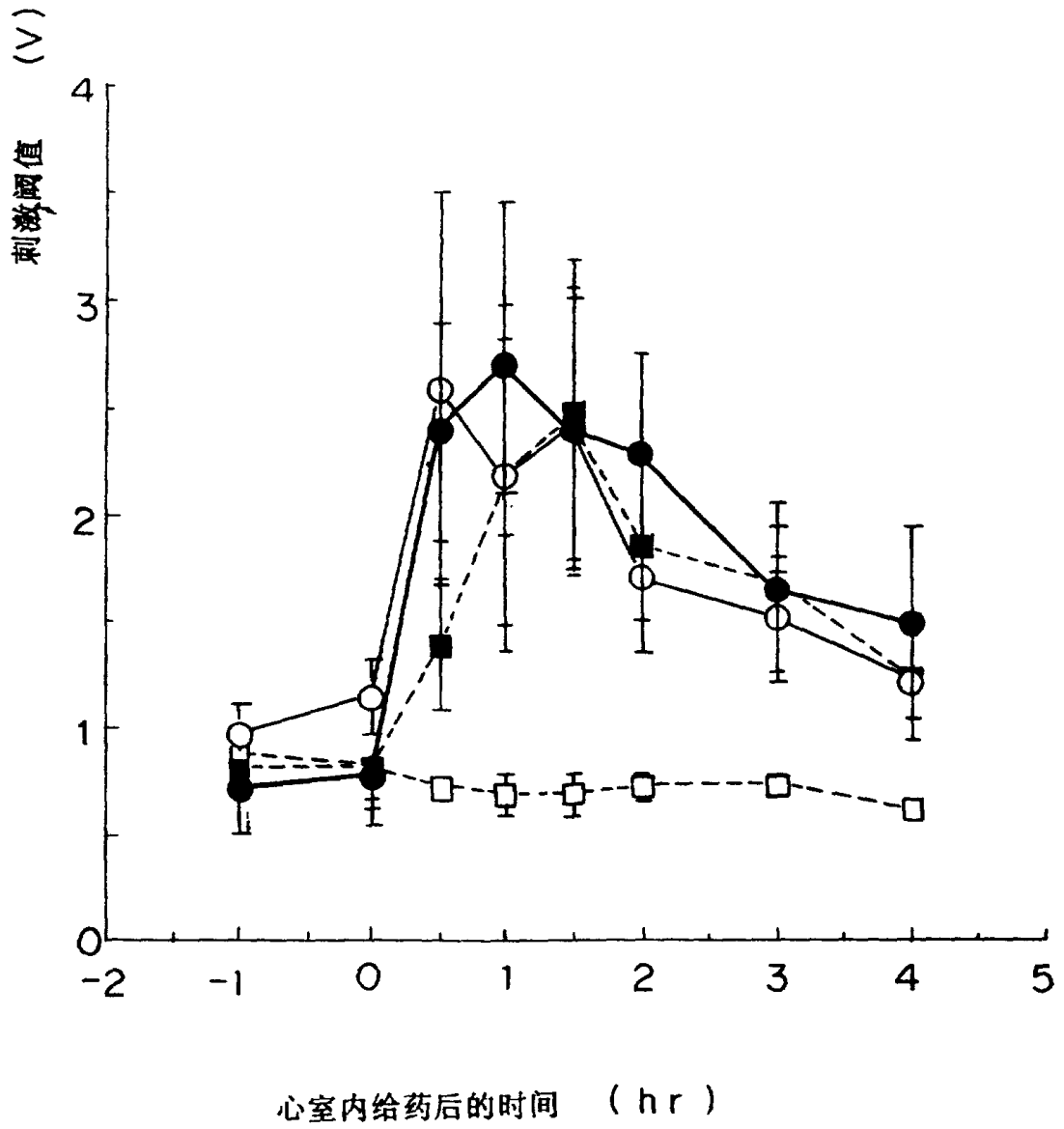
本发明的杂种降钙素具有突出的优点，它同鲑鱼，鳕鱼和鸡降钙素一样具有很强的生物活性，而且不引起任何副作用，包括如恶心，消化道功能紊乱和抗原性。同时通过将人降钙素中的 Met⁸ 变成 Val⁸ 可以防止在合成中遇到的副反应问题。

图1



- 对照
- 杂种降钙素 1
- △— 鲑鱼降钙素
- 人降钙素

图2



- 生理盐水
- 鲑鱼降钙素
- 人降钙素
- 杂种降钙素 1

图3

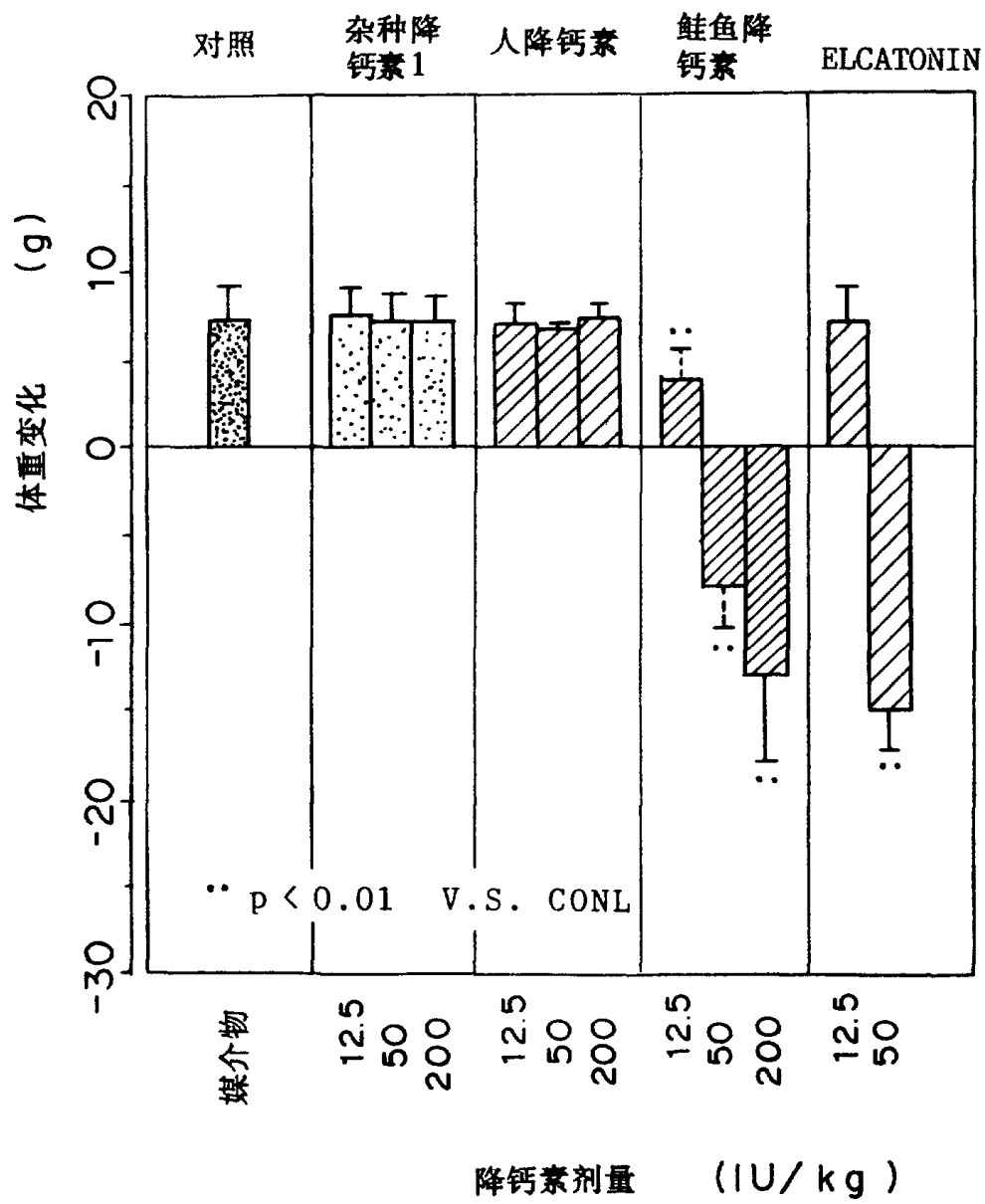


图 4

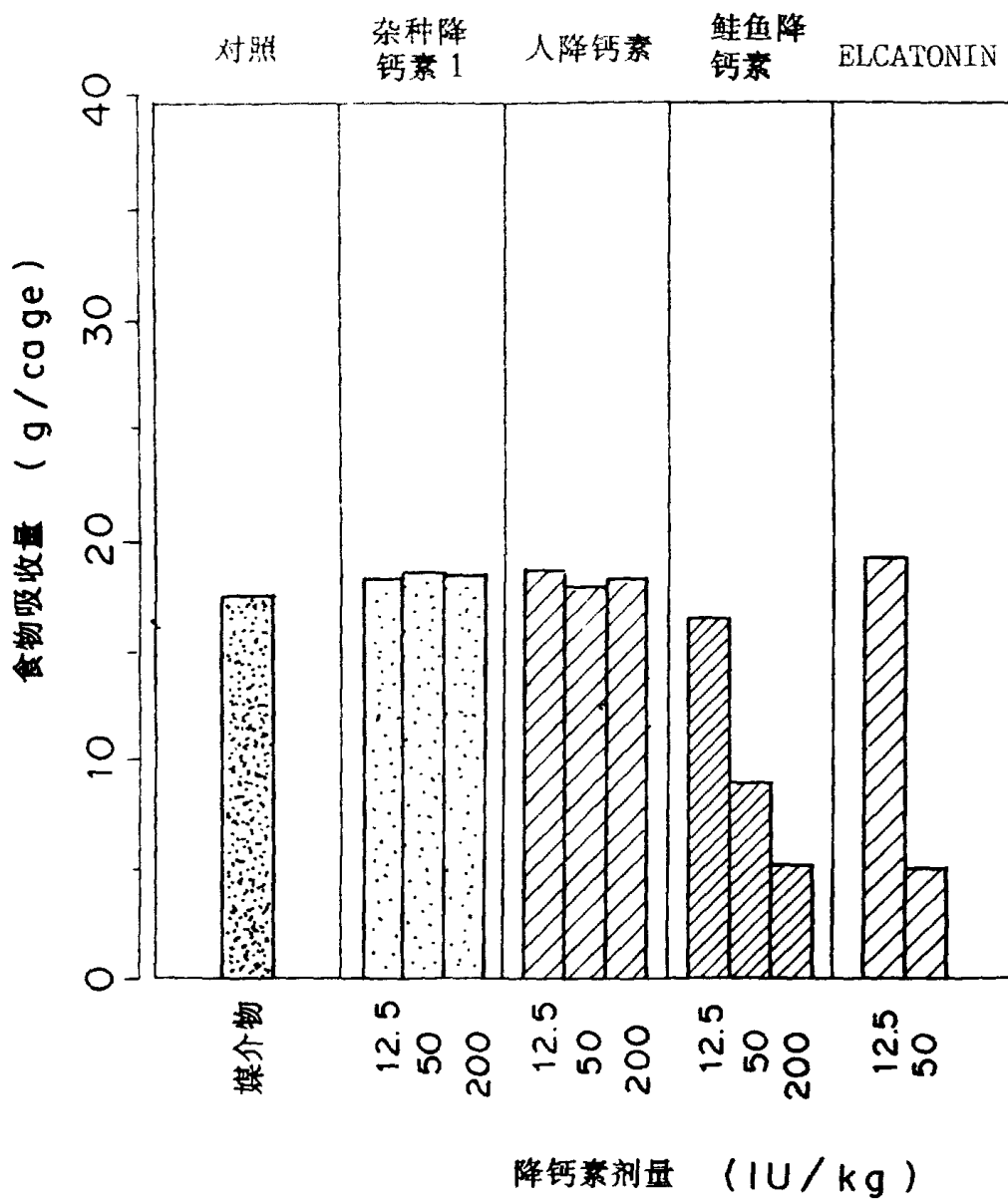


图 5

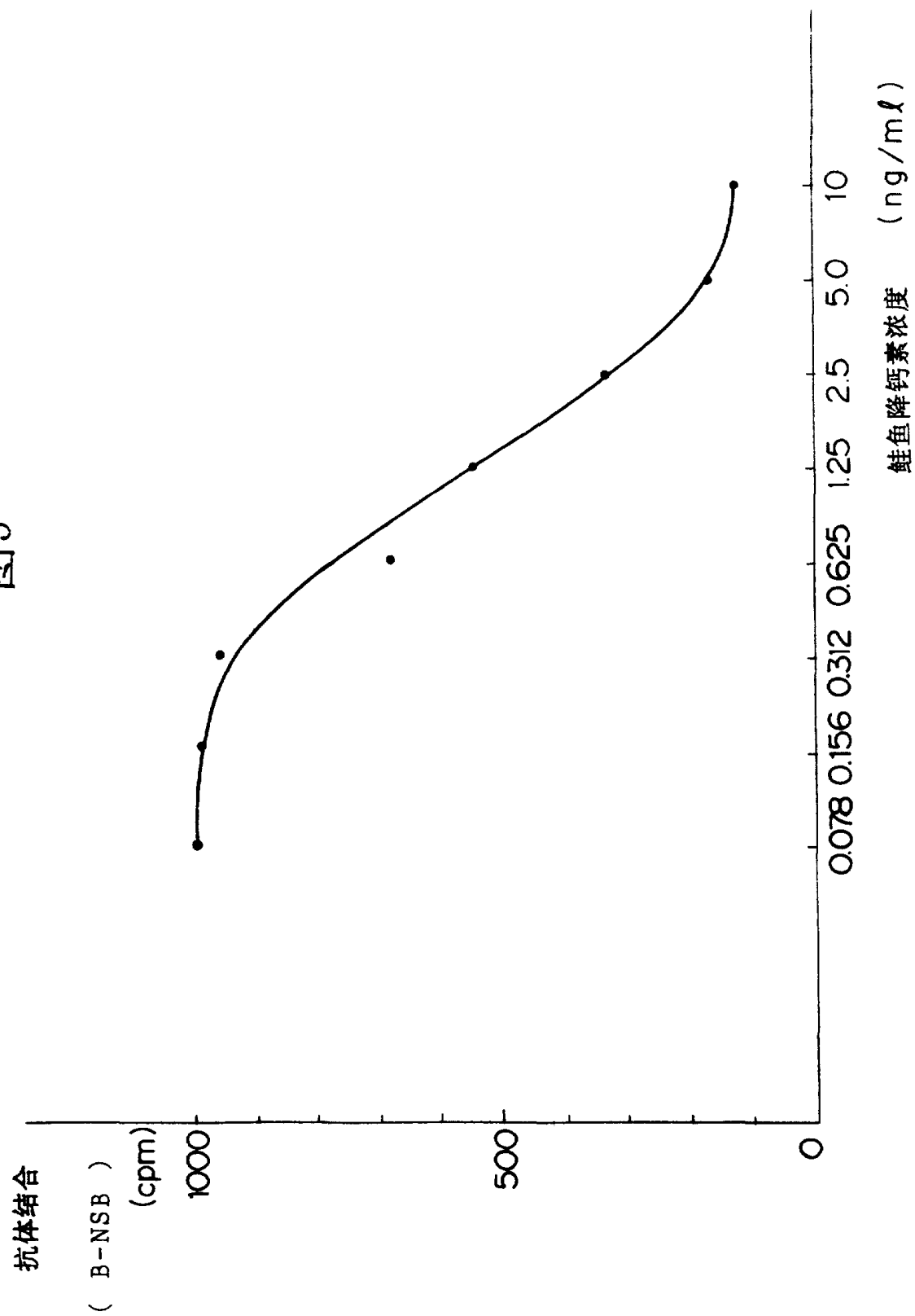


图6

① 1号血清

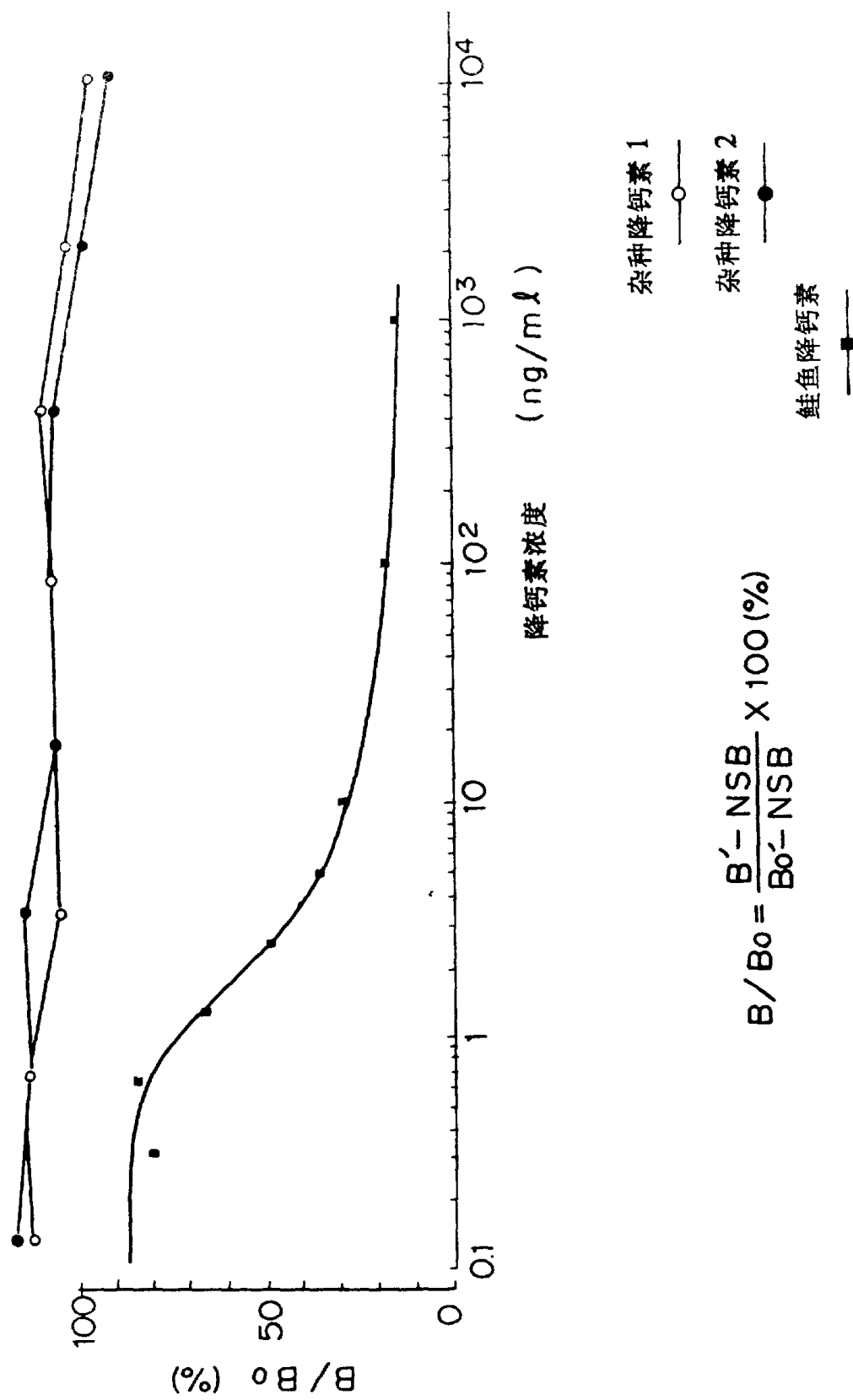
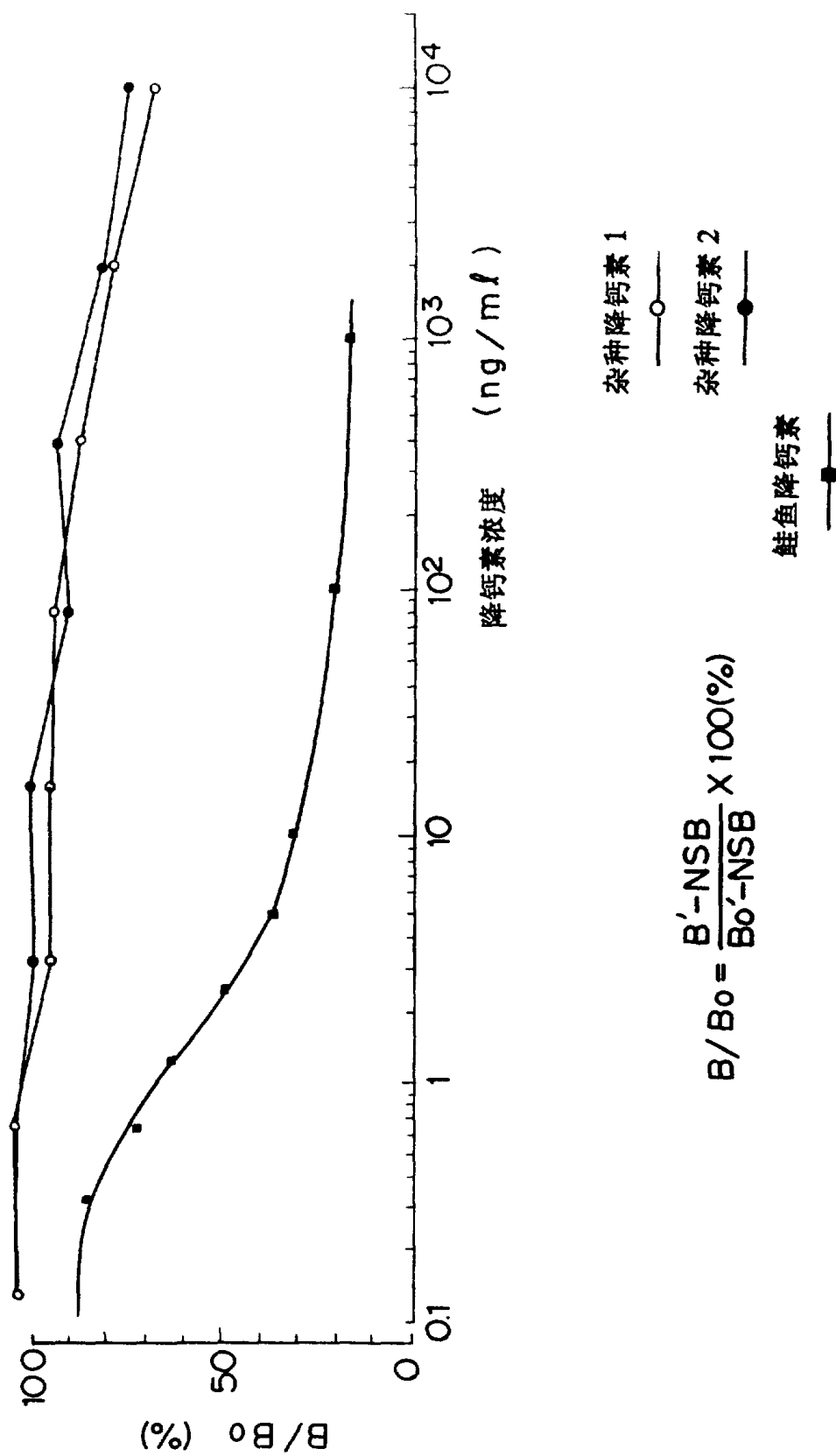


图7

② 2号血清



$$B/B_0 = \frac{B' - NSB}{B_0' - NSB} \times 100(\%)$$

图8

③ 3号血清

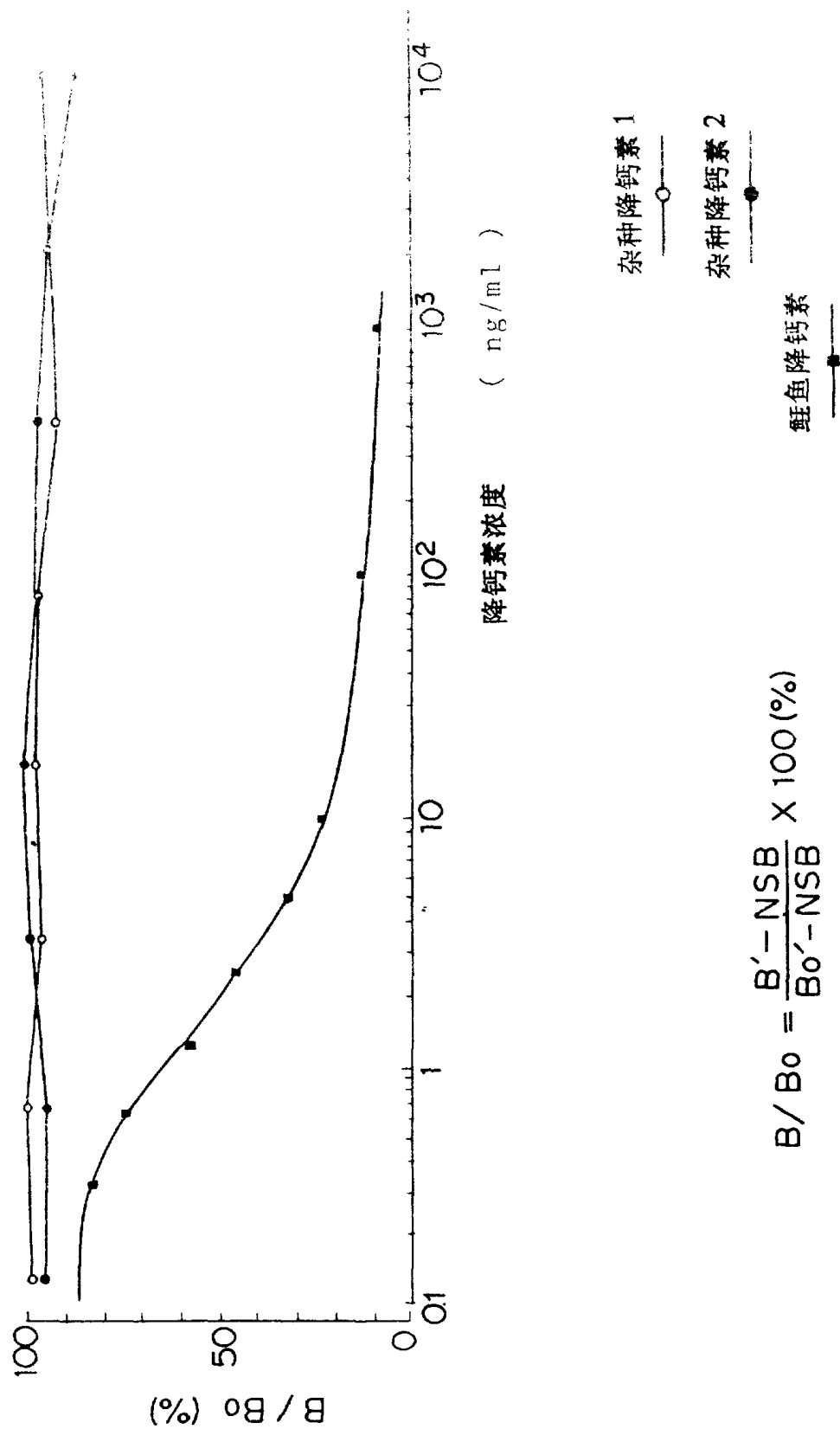


图9

